DER EINFLUSS VON PHENYLBUTAZON AUF DIE BINDUNG VON PHARMAKA AN KANINCHENMUSKULATUR

Albrecht Ziegler

1978

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41554611_0020

Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität München

Direktor: Prof. Dr. Manfred Kiese

DER EINFLUSS VON PHENYLBUTAZON AUF DIE BINDUNG VON PHARMAKA AN KANINCHENMUSKULATUR

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin

an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Albrecht Ziegler

aus Stuttgart

1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. H. Kurz

Mitberichterstatter: Prof. Dr. M. Kiese

Dekan: Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 13.6.1978

Meinen Eltern
in Dankbarkeit gewidmet

Herr Prof. H. Kurz war jederzeit bereit bei der Ausarbeitung seines Themas zu beraten und zu unterstützen. Ich möchte Ihm dafür danken.

Inhaltsverzeichnis:

I. Einleitung 1

II. Methodik 3
1. Herstellung des Muskelhomogenates 3
2. Ansätze zur Homogenisierung 5
3. Ultrafiltration 6
4. Nachweismethoden der Pharmaka 8
5. Berechnung der Bindung an das Homogenat 8
6. Statistische Auswertung 9

III. Ergebnisse 11

IV. Diskussion 15
1. Kritik der Methode
a) Muskulatur und Homogenatkonzentration 15
b) Ultrafiltration 17
c) Probleme der Ultrafiltration 18
2. Diskussion der Ergebnisse 21
3. Diskussion der Bindung an Muskelgewebe
a) Bindung an Muskelgewebe 30
b) Beeinflussung der Bindung an Muskelgewebe 31
c) Zunahme der Bindung an Muskelgewebe 32
d) Auswirkung einer Bindungsänderung 33
4. Vergleich der Bindung an Plasma und an Muskelgewebe 35

V. Zusammenfassung 37

VI. Literaturverzeichnis 38

I. Einleitung

Unter den unerwünschten Zwischenfällen in der Pharmakotherapie beanspruchen diejenigen, die auf Wechselwirkungen von Arzneimitteln zurückgehen, zunehmendes Interesse. Die Beeinflussung der Bindung eines Pharmakons an die Makromoleküle des Organismus durch Phenylbutazon ist ein Beispiel für eine solche Wechselwirkung.

Wird bei einer in vivo nachweisbaren Wirkungsverstärkung eines Arzneistoffes an eine Freisetzung aus der Eiweißbindung gedacht, so diente bisher als Erklärung meist eine Verdrängung von den Transportproteinen, hauptsächlich dem Plasmaalbumin (Aggeler et al. 1967, Hanstein 1973, Wesseling 1975)

Auch in der experimentellen Pharmakologie ist das Plasma mit seiner vielseitigen Bindungsfähigkeit und seiner direkten "Lieferfunktion" an den Rezeptor gegenüber den bindungsfähigen Geweben im Körper das bevorzugte Objekt. Bereits Goldstein (1949) hat in seinem klassischen Übersichtsartikel über die Proteinbindung die zusammenhängende Bedeutung von Plasma und Gewebe ausgedrückt: "Plasma ist ein zirkulierendes Gewebe .... Es ist nur die leichte Verfügbarkeit, die das Plasma sich selbst zur Erforschung anbieten läßt". Kristensen (1976) formulierte in einem Übersichtsartikel den heutigen Stand: "Es ist wenig bekannt über die Interaktion zwischen Arzneistoffen und Gewebeproteinen".

Die Gewebe wie z.B. Muskulatur, Leber, Lunge sowie das Hämoglobin stellen durch ihren quantitativen Anteil und durch ihre spezifische Bindungsfähigkeit (Ludden et al. 1976) einen entscheidenden Faktor für Verteilung und Ausscheidung im Organismus dar.

Erwartet man eine Beeinflussung der Gewebebindung von Pharmaka durch ein zweites Pharmakon, so ist die Auswirkung auf den pharmakologisch wirksamen, nämlich auf den nicht gebundenen Anteil bei dem Gewebe am ausgeprägtesten zu erwarten, welches im Körper die größte Masse hat. Die Muskulatur repräsentiert 40 % der Proteinstrukturen des Körpers.

Die Aufgabe dieser Arbeit war es, zum Verständnis der Interaktion von Phenylbutazon mit verschiedenen Pharmaka beizutragen. Es wurde untersucht, ob die Bindung verschiedener Pharmaka an homogenisiertes Kaninchen-Muskelgewebe durch Phenylbutazon beeinflusst wird.

II. Methodik

1. Herstellung des Muskelhomogenates

Das Muskelfleisch stammt von gesunden Kaninchen, die durch Nackenschlag getötet und anschließend entblutet wurden. Zur Homogenisierung besonders geeignet war die faszienarme Muskulatur von Musculus psoas und Musculus erector trunci. Die freipräparierten Muskeln wurden von Fett und nichtmuskulären Anteilen befreit, mit einem Tuch abgetupft und sofort im Fleischwolf zerkleinert. Das Muskelfleisch wurde dann unter + 10° C abgekühlt. In keinem weiteren Verarbeitungsschritt stieg die Temperatur des Ansatzes über 10° C an. Zum zerkleinerten Muskelfleisch wurde nacheinander zugegeben:

Die berechnete Menge Arzneistoff in 0,05 molarem Phosphatpuffer gelöst und die berechnete Menge gesättigter Natriumkarbonatlösung (siehe unten). Die Endkonzentration an Arzneistoff (Primärsubstanz = PS) im Homogenat war einheitlich 10^{-4} molar. Phenylbutazon Sekundärsubstanz = SS) wurde äquimolar (10^{-4} molar) oder bei ausgewählten Arzneistoffen zusätzlich 5×10^{-4} und 10×10^{-4} molar zugegeben.

Der Ansatz wurde 3 Minuten lang bei 10 000 Umdr./Min. homogenisiert [1]. Es wurde darauf geachtet, daß zur Vermeidung von lokaler Erwärmung der Homogenisator nur kurzzeitig lief. Hierbei wurde der in Abb. 1 dargestellte Auflösungsgrad der Muskulatur erreicht. Die Endkonzentration an Muskulatur im Homogenat war 50 %.

Mikroskopische Darstellung des Muskelhomogenates

Durch die Homogenisierung wird der Verband der Muskelfasern aufgelöst. Die in der intakten Muskelzelle nebeneinanderliegenden Muskelfibrillen schwimmen frei im Puffer. Auf Grund

[1] Gerät: "Tornado" Firma Emmendinger Maschinenbau

der Abbildung (Abb. 1) kann man annehmen, daß die gelösten Arzneistoffe kurze Diffusionswege zu den bindenden Strukturen des aufgefaserten Muskelverbandes haben.

Abb. 1: Mikroskopisches Bild eines Ausstrichpräparates von Muskelhomogenat. Vergrößerung: 500 fach. Die 2 µm großen A und I Filamente sind perlschnurartig erkennbar. Die Zellkerne sind erhalten (⟶ K)

Durch Kühlung im Eisbad unter 10° wurde die postmortal durch anaerobe Glykolyse ablaufende Säuerung der Muskulatur verzögert. Nach Frunder (1951) kann der intrazelluläre pH Wert in der Kaninchenmuskulatur postmortal bis auf pH 5,8 absinken. In Anlehnung an Fichtl (1974) und nach eigenen Vorversuchen stellten wir fest, daß eine Rücktitration des pH Wertes bis 7,0 dadurch möglich war, daß, berechnet auf 100 gr Muskulatur, dem Ansatz 2 ml gesättigte Natriumkarbonatlösung zugegeben wurden. Die Pufferkapazität reichte dann aus, um den pH Wert des Homogenates auf pH 7,0 zu halten. Das entspricht dem intrazellulären pH der Kaninchenmuskulatur.

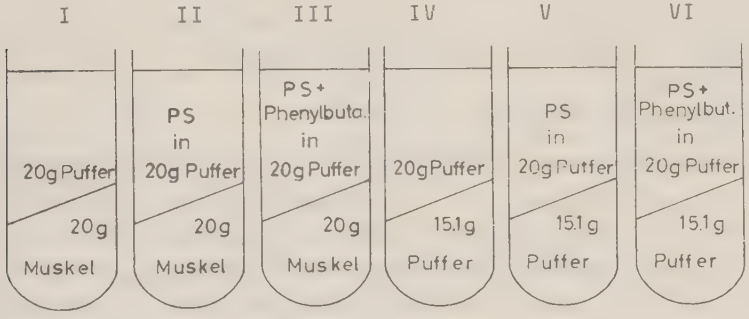
In der folgenden Übersicht sind die Versuchsbedingungen gesondert angegeben. Im Text werden diese unveränderlichen Daten nicht mehr wiederholt.

Muskelkonzentration im Homogenat	50 %
pH Wert des Muskelhomogenates	7,0
Arzneistoffendkonzentration (PS)	10^{-4} mol.
Arzneistoffendkonzentration (SS) Phenylbutazon	1, 5 und 10x 10^{-4} mol.
Temperatur des Homogenates	+ 10^{0} C
Homogenisierungszeit (bei 10 000 Umdr.)	3 Min.
Homogenatmenge im Dialysierschlauch	15 gr
Ultrafiltration: 270 x g (= 1 atü)	
Filtrationszeit	5 Std.
Temperatur	2^{0} - 4^{0}
Ultrafiltrat	ca. 1 ml

Tab. 1: Daten, die bei allen Ansätzen konstant waren

2. Ansätze zur Homogenisierung

Die folgende Übersicht zeigt die einzelnen Ansätze zur Bestimmung der Bindung des Pharmakons an das Muskelhomogenat.



PS = Primärsubstanz

Abb 2: Übersicht über die einzelnen Ansätze vor der Homogenisierung

Für den Vergleichsansatz mit Puffer an Stelle von Muskulatur berechnet sich das einzusetzende Puffergewicht wie folgt:

75,6 % von 20g = 15,1 g

75,6 % ist der Wassergehalt der Kaninchenmuskulatur.

Der Wassergehalt der Kaninchenmuskulatur

Der Wassergehalt der Kaninchenmuskulatur stellt das Volumen dar, in welchem sich der Arzneistoff in der Muskulatur verteilen kann. In einem entsprechenden Volumen Puffer wurde der Arzneistoff bzw. die Arzneistoffe in den Ansätzen ohne Muskulatur gelöst. Die Auswertung dieser Ansätze (Ansatz IV,V, und VI in Abb. 2) ergibt die Vergleichswerte an Arzneistoffgehalt im Filtrat, wenn keine Bindung an die Muskulatur stattgefunden hat.

Der Wassergehalt wurde bestimmt durch Trocknen von 20 g Muskulatur bei 105° bis zur Gewichtskonstanz. Als Mittelwert mehrerer Messungen ergab sich ein Wassergehalt von 75,6 %. Hieraus errechnet sich ein Feststoffgehalt im Homogenat von 12,2 %. Das sind Proteine, Elektrolyte und andere Zellbestandteile. Der reine Proteingehalt der Kaninchenmuskulatur beträgt nach Literaturangaben und nach Umrechnung auf das Homogenat 10 % (Hasselbach 1971).

3. Die Ultrafiltration

Die an Muskelprotein gebundene Arzneistoffmenge berechnet sich aus der Differenz von Gesamtmenge an Arzneistoff und der Menge an ungebundenem Arzneistoff. Um die Konzentration an nicht gebundenem Arzneistoff im Muskelhomogenat zu bestimmen, kam die Methode der Ultrafiltration zur Anwendung. Hierbei wird durch "Visking" Dialysierschläuche[1] als Filtermembran ein eiweißfreies Ultrafiltrat hergestellt, in welchem die Konzentration des nicht an Muskelprotein gebundenen Arzneistoffes bestimmt wird. Hierzu wurden 15g

[1] Material: Visking Dialysierschläuche, Typ 20/32
Serva-Feinbiochemica, Heidelberg

Homogenat in einen Dialysierschlauch eingebracht. Der möglichst luftfrei mit Homogenat gefüllte Dialysierschlauch wurde an den Enden gut verknotet und dann in einen verchromten Siebeinsatz gelegt (siehe Abb. 3). Der Siebeinsatz hing in einem Zentrifugenglas, um das Filtrat zu sammeln

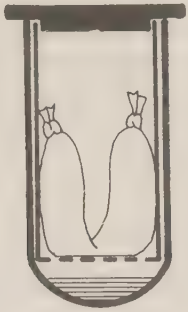


Abb 3: Vorrichtung zur Ultrafiltration

In einer gekühlten Zentrifuge (+ 2-4°) wurde anschließend bei 270 x g (das ist 1 atü) 1 ml eiweißfreie Flüssigkeit abfiltriert. Wenn die Nachweismethode es zuließ, so bei den spektrofluorometrischen Bestimmungen, genügte eine geringere Menge an Ultrafiltrat. Für 1 ml betrug die Filtrationszeit 5 Stunden.

4. Nachweismethoden der Pharmaka

Die Konzentrationen der Substanzen im Ultrafiltrat wurden photometrisch bestimmt. Dabei wurden folgende Nachweismethoden verwendet:

CHININ	nach Alkalisieren mit 1n NaOH Extraktion in Heptan, Reextraktion in o,1n H_2SO_4/H_2O, Best. spektrofluorometr.: Anregungslicht 359 nm, Fluoreszenzmessung: 442 nm
MORPHIN	Spektrofluorometr. Best. nach H. Kupferberg (1964): Anregungslicht 250 nm, Fluoreszenzmessung 440 nm
NITROFURANTOIN	wurde nach Alkalisieren mit 0,05 mol. Natriumtetraboratlösung photometrisch bestimmt: Messung bei 388 nm
NITROSALIZYLSÄURE	nach Ansäuren mit HCl conc. Extraktion in Chloroform, Reextraktion in 1n $NaOH/H_2O$, Messung bei 410 nm
PHENPROCOUMON	Methode nach Seiler und Duckert (1968) modifiziert: Aus salzsaurer Probe in Dichloräthan extrahiert, Reextraktion in $NaOH/H_2O$ (10 %), Bestimmung spectroflourometrisch: Anregungslicht 313 nm, Fluoresz. messung bei 400 nm
SULFADIMETHOXIN	Diazo-reaktion nach Bratton und Marshall (1939)
THIOPENTAL	nach Goldbaum (1948) und Brodie et al. (1950)
TOLBUTAMID	nach Spingler (1957): Lösung in Amylacetat, bei 140^{o} 10 Min. im Glyzerinbad, Kupplung des freigesetzten Butylamin mit Dinitrofluorbenzol, Bestimmung am Photometer: 335 nm

5. Die Berechnung der Bindung an das Homogenat

Für jede Nachweismethode einer Primärsubstanz war der Einfluß von Phenylbutazon untersucht worden. Am registrierenden Spektralphotometer (Firma Cary) konnte gezeigt werden, daß die Extinktion der Primärsubstanz durch die Anwesenheit von Phenylbutazon nicht beeinflußt wird. Die Gültigkeit des Lambert-Beerschen Gesetzes war in Vorversuchen für den entsprechenden Konzentrationsbereich gesichert worden.

Aus den Meßwerten der optischen Bestimmungsmethoden läßt sich die Bindung nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Bindung (in \%)} = 100 \cdot \left[1 - \frac{E_H - E_H^o}{E_P - E_P^o} \right]$$

Hierbei ist

E_P^o -Extinktion des Ansatzes: nur Puffer
E_P -Ext. des Ansatzes: Arzneistoff in Puffer
E_H -Ext. des Ansatzes: Arz.stoff in Homogenat
E_H^o -Extinktion des Ansatzes: nur Homogenat

6. Statistische Auswertung

Die Beurteilung von Unterschieden bei den Mittelwerten der Muskelbindung erfolgte unter der Annahme einer angenäherten Normalverteilung der Einzelwerte im t-Test nach STUDENT. Die Signifikanzgrenze war $2p < 0{,}01$, das entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1%.

Aus den Meßwerten der optischen Bestimmungsmethoden läßt sich die Bindung nach folgender Formel berechnen:

$$\text{Bindung (in \%)} = 100 \cdot \left[1 - \frac{E_H - E_H^o}{E_p - E_p^o} \right]$$

Hierbei ist

E_p^o -Extinktion des Ansatzes: nur Puffer
E_p -Ext. das Ansatzes: Arzneistoff in Puffer
E_H -Ext. des Ansatzes: Arz.stoff in Homogenat
E_H^o -Extinktion des Ansatzes: nur Homogenat

6. Statistische Auswertung

Die Beurteilung von Unterschieden bei den Mittelwerten der Muskelbindung erfolgte unter der Annahme einer angenäherten Normalverteilung der Einzelwerte im t-Test nach STUDENT. Die Signifikanzgrenze war $2p < 0{,}01$, das entspricht einer Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1%.

III. Ergebnisse

Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4 und 5 zusammengefaßt. Die Bindung von acht verschiedenen Arzneistoffen (Primärsubstanzen = PS) an Muskelhomogenat ist in der ersten Spalte angegeben. Die Spalte zwei zeigt, wie sich die Bindung der Primärsubstanzen durch die Anwesenheit von Phenylbutazon verändert hat. Die Säulen geben die Bindung in % als Mittelwert aus 15 Messungen ($n = 15$) wieder.

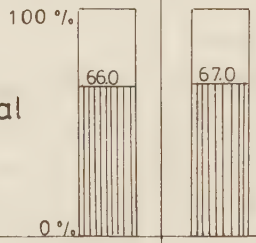
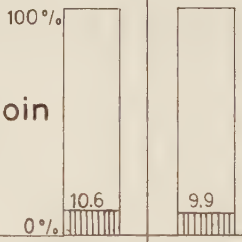
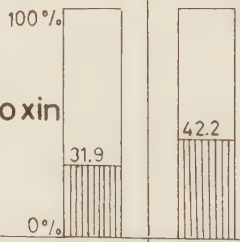
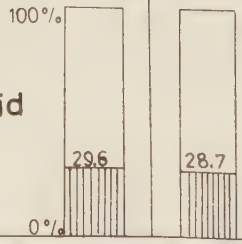
Spalte 4: zeigt die Vergleichswerte aus der Literatur für die Plasmabindung (Friemel 1968, Höllt 1973, Niedner 1973).

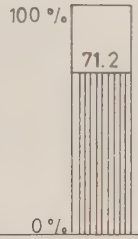
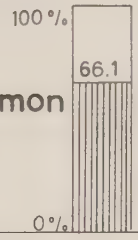
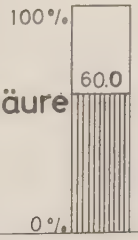
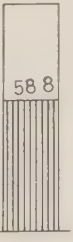
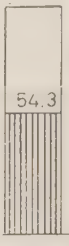
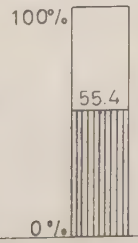
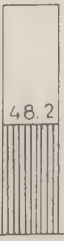
t-Test: in der Spalte t-Test ist angegeben, ob der Unterschied der Mittelwerte von Säule eins (nur PS) und den Säulen mit Phenylbutazon verschiedener Konzentration signifikant war. Eine Signifikanz wurde dann angenommen, wenn eine Irrtumswahrscheinlichkeit von unter 1 % bestand ($p < 0,01$).

Abbildungen 4 und 5: Die Bindung von acht Pharmaka an Muskelhomogenat allein und in Konkurrenz mit Phenylbutazon

PS = acht verschiedene Pharmaka

SS = Phenylbutazon

Bindung an Muskelhomogenat		n	Bindung an Plasma (Kaninchen)	t-Test für PS:SS=1:1
nur PS	PS:SS = 1:1			
Thiopental 		15	89.6 % (F)	$p < 0.01$
Nitrofurantoin 		15	74.0 % (F)	n. s.
Sulfadimethoxin 		15	98.6 % (F)	$p < 0.01$
Tolbutamid 		15	96.4 % (F)	n. s.

Bindung an Muskelhomogenat				n	Bindung an Plasma (Kaninchen)	t-Test
nur PS	PS: SS = 1:1	1:5	1:10			
Chinin 				15	61.1 %(F)	n. s. bis 1:10
henprocoumon 				15	97.0 %(N)	p< 0.01 ab 1:1
itro salizylsäure 				15	96.7 %(F)	p< 0.01 ab 1:5
Morphin 				15	27.0 %(H)	p<0.01 ab 1.1

In den Abbildungen 4 und 5 ist angegeben, daß die Bindung von Thiopental, Tolbutamid, Sulfadimethoxin und Nitrofurantoin im Ansatz mit äquimolaren Mengen von Phenylbutazon gemessen worden sind. Die Bindung von Phenprocoumon wurde zusätzlich mit einer fünffach höheren Phenylbutazon Konzentration gemessen. Bei Nitrosalizylsäure, Morphin und Chinin wurde Phenylbutazon in drei verschiedenen Konzentrationen zugegeben: 1 : 1, 1 : 5 und 1 : 10.

Als Ergebnis zeigte sich eine signifikante Zunahme der Bindung an Muskelhomogenat durch die Anwesenheit von Phenylbutazon bei Thiopental und Sulfadimethoxin. Die Bindung von Tolbutamid, Nitrofurantoin und Chinin blieb durch Phenylbutazon unbeeinflusst. Eine deutliche Freisetzung aus der Bindung erfuhr Phenprocoumon und Morphin, verstärkt bei Erhöhung der Phenylbutazon-Konzentration. Nitrosalizylsäure wurde erst bei 5-fach höherer Phenylbutazon Konzentration aus der Bindung an die Muskulatur verdrängt.

IV. Diskussion

1. Kritik der Methode

a) Die Muskulatur

Auch innerhalb einer Spezies treten von Individuum zu Individuum Unterschiede in den Bindungseigenschaften der Körperproteine auf. In unserer Versuchsanordnung ist dieser Unterschied dadurch gering gehalten worden, daß wir nur Tiere verwendet haben, die unter derselben Ernährung und unter denselben Bedingungen gelebt haben. Zusätzlich haben wir um Schwankungen auszugleichen das Muskelfleisch von drei Tieren in einem Ansatz vereinigt.

Die Bedeutung der Konzentration an Muskelgewebe

Wie für Plasma so gilt auch für Muskelhomogenat, daß die Bindung eines Arzneistoffes mit steigender Konzentration an Muskelgewebe im Homogenat zunimmt. Für Thiopental und Sulfadimethoxin ist in der folgenden Abbildung die Beziehung zwischen Bindung und Konzentration an Muskelgewebe im Homogenat dargestellt.

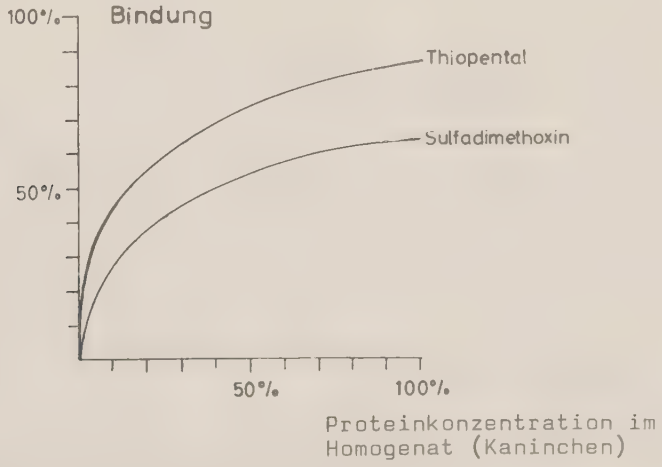


Abb. 6: Bindung zweier Pharmaka an Muskelprotein bei steigender Proteinkonzentration (nach Fichtl 1974)

Die Abbildung 6 zeigt die Ergebnisse von Fichtl (1974) deren Auswertung auf Überlegungen von Gillette (1963) basiert. Bei vielen Pharmaka drückt folgende Gleichung die Abhängigkeit der Bindung von der Konzentration an Muskelgewebe im Homogenat aus:

$$B = \frac{100}{1 + \frac{100}{K \cdot H}}$$

hierbei ist B der gebundene Anteil (in g%)
H die Konzentration des Muskelgewebes im Homogenat
K eine für jeden Arzneistoff spezifische Konstante

Wenn obige Gleichung für einen Arzneistoff gültig ist, wie es für Sulfadimethoxin und Thiopental von Fichtl (1974) nachgewiesen worden ist, so genügt es bei e i n e r Konzentration an Muskelgewebe zu messen. Die Konstanze K in obiger Gleichung ist dann berechenbar und damit alle weiteren bei höherer und niedrigerer Konzentration zu erwartenden Bindungswerte. In vorliegender Arbeit war es demnach möglich mit einem verdünnten Muskelhomogenat zu arbeiten. Umrechnungen auf ein Homogenat mit höherer Konzentration an Muskelgewebe sind nach obiger Formel möglich.

Warum 50 % Muskulatur im Muskelhomogenat?

Ein nicht geringer Vorteil des verdünnten Muskelhomogenates ist seine gute Handhabung. Die Konsistenz des Homogenates nach der Homogenisierung ist breiig-zähflüssig: Hierdurch ist ein luftfreies Einfüllen des Muskelhomogenates in die Dialysierschläuche erleichtert. Luftblasen im Muskelbrei könnten die Filtration während der Zentrifugation beeinträchtigen. Ein Pufferanteil von 50 % im Homogenat ermöglicht, daß die Arzneistoff Stammlösung nicht zu konzentriert angesetzt werden muß.

Ein verdünntes Homogenat kann auf schonende Weise homogenisiert werden. Eine Erwärmung während der Homogenisierung

kann eine Veränderung der Proteine und eine nicht abschätzbare Veränderung der Bindungseigenschaften zur Folge haben. Deshalb wurde immer nur kurzzeitig homogenisiert.

Wie in Abb. 1 ersichtlich, vermag schon eine kurzzeitige Homogenisierung eine vollständige Zerreißung des Muskelverbandes hervorzurufen. Brodie und Hogben (1957) vergleichen die Zellwände von Gewebezellen mit Lipoidmembranen, die nur für lipophile Pharmaka gut durchgängig sind. Somit war es wichtig während der Homogenisierung neben der Auflösung des Zellverbandes teilweise auch hindernde Lipoidmembranen zu zerstören. Es muß allerdings angeführt werden, daß vergleichende Messungen ergeben haben, daß am intakten und am homogenisierten Zwerchfell der Ratte nach ausreichender Diffusionszeit keine quantitativen Unterschiede in der Muskelbindung aufgetreten sind (Filous et al. 1976). Dies galt sogar für eine schlecht "gewebegängige" quarternäre Ammoniumbase.

b Die Ultrafiltration

Die Proteinbindung kann nicht direkt, sondern nur aus der Differenz von ungebundenem Anteil zur Gesamtmenge an Arzneistoff berechnet werden. Die Konzentration an ungebundenem Arzneistoff wird bestimmt durch Abtrennung eines proteinfreien Filtrats. Die Konzentration des Arzneistoffes im Ultrafiltrat muß in hoher Annäherung der Konzentration an ungebundenem Arzneistoffanteil im Muskelhomogenat entsprechen. Die Methode der Ultrafiltration kommt diesem Ziel nahe (Kurz et al. 1977). Wir verwandten eine Modifikation der von Feldmann (1950) beschriebenen Ultrafiltrationsmethode. Die Alternativmethode der Dialyse ist ungeeignet, weil für ein Muskelhomogenat eine zu lange Dialysierzeit bis zum Konzentrationsausgleich zu erwarten ist.
Die Visking Dialysierschläuche variieren in der Porengröße zwischen 0,7 und 2,1 nm (Renkin 1955). Damit können Proteine vom Molekulargewicht 10-20 000 und höher im Filtrat ausgeschlossen werden (Craig et al. 1961).

C Probleme der Ultrafiltration

a Filtrationshemmung in Abhängigkeit von der Molekülgröße

Renkin (1955) fand einen Siebeffekt der Zellulosemembran zwischen Arzneistofflösung und Filtrat. Während der Ultrafiltration passieren die Wassermoleküle die Filtermembran schneller als die Arzneistoffmoleküle. Molekülgröße, Molekülduchmesser und die sterische Konfiguration des Arzneistoffes sind hierbei entscheidende Faktoren (Kurz et al. 1977). Das Molekulargewicht gibt einen Hinweis auf die zu erwartende Konzentrationsdifferenz zwischen Ausgangslösung und Filtrat. Bis MG 300 wird der Fehler mit 2 % angegeben. Chinin (MG 324) und Sulfadimethoxin (MG 310) hatten ein geringfügig höheres Molekulargewicht. Zusätzlich wurde der Siebeffekt klein gehalten durch einen geringen Druckgradienten am Filter: 270 x g = 1 atü. Dies wurde mit einer langen Filtrationszeit von 5 Stunden für 1 ml Filtrat erkauft.
Im Folgenden sind für vier Pharmaka die Siebkoeffizienten bei proteinfreier Ausgangslösung angegeben.

Phenylbutazon	0.98
Nitrofurantoin	0.92 - 0.99
Sulfadimethoxin	0.96
Chinin	0.99

Tabl. 2: Vier Beispiele von Siebkoeffizienten (Fichtl 1974)
(= Konzentration im Ultrafiltrat/
Konzentration in der Ausgangslösg.)

b Störung der Filtration durch Membranladung

Da es sich bei den hier verwandten Pharmaka teilweise um polare Moleküle handelt, käme einer Membranladung ein Siebeffekt zu. Nach Craig und Ansevin (1963) ist die Zellulose Filtermembran ungeladen.

d Donnaneffekt

Bei Trennung des proteinhaltigen Homogenates von proteinfreiem Filtrat spielt für ionisierte Arzneistoffe der Donnaneffekt eine gewisse Rolle. Die Arzneistoffe, die wir untersucht haben, sind beim pH der Muskulatur von 7,0 teilweise stark ionisiert. Der Donnaneffekt wirkt sich nur auf ungebundene Moleküle aus. Niedrige Bindung und eine Ionisation von über 90 % bei pH 7,0 liegt von unseren Arzneistoffen bei Sulfadimethoxin, Nitrosalizylsäure und Morphin vor. Obwohl die Donnan-Korrektur für die letzgenannten Arzneistoffe kleine Bindungsänderungen nach oben (anionische Arzneistoffe) oder nach unten (kationische Arzneistoffe) ausmachen würde, wurde auf die Korrektur verzichtet, weil für unsere Aussage der Absolutwert der Bindung nicht von entscheidender Bedeutung ist.

e Einfluß der Gewebeproteine auf die Membranpassage

v.Bruck und Kuhne (1962) fanden bei der Ultrafiltration von Serum (Kalb) einen Rückhalteeffekt durch eine teilweise Abdichtung der Zellulosemembran mit Eiweiß. Diese Messungen führten zu dem Schluß, die Ultrafiltrationsmethode sei keine brauchbare Methode. Dies steht im Widerspruch zu anderen Autoren, welche die Ultrafiltration unter Beachtung ihrer Grenzen für eine brauchbare Methode halten (Rieder 1963, Kunin 1966, Kurz et al. 1977).

f Die Konzentrationsänderung während der Filtration

Gillette (1963) gibt auf Grund theoretischer Ableitungen an, daß die Menge an nicht proteingebundenem Arzneistoff D_f vom Verhältnis

$$D_f \approx \frac{\text{Volumen}}{\text{Proteinkonzentration}}$$ abhängt.

Während der Ultrafiltration steigt die Konzentration an Muskeleiweiß im Homogenat an. Hierdurch wird die Konzentra-

tion an nicht gebundenem Arzneistoff erhöht. Dieser Fehler läßt sich dadurch vermeiden, daß die Ultrafiltratmenge gegenüber der Menge des zur Filtration eingesetzten Homogenats klein gehalten wird. Nach Kurz et al. (1977) soll die Filtratmenge unter 20 % gehalten werden. Wir konnten mit einer Filtratmenge von 0,5 - 1,5 ml entsprechend 5 - 15 % der Ausgangsmenge (15 g) auskommen.

2. Diskussion der Ergebnisse

P h e n y l b u t a z o n

MG 308	pK_a 4,5
Ionisationsgrad bei pH 7,0	99%

Nach klinischen Beobachtungen kann Phenylbutazon die Wirkung anderer Pharmaka verstärken (Sigg 1956, Eisen und Yonkers 1964). Es wurde nachgewiesen, daß durch Phenylbutazon ein im Plasma von Mensch oder Labortier gebundenes Pharmakon verdrängt werden kann (Anton 1960: Sulfaethylthiadiazol, Kurz und Baur 1967: Thiopental, Aggeler et al. 1967: Warfarin, Solomon und Shrogie 1968: Warfarin und Tolbutamid, Baur 1969: Sulfadimethoxin, Wardell und Mc.Queen 1971: Sulfadoxine, Imamura et al. 1975: Sulfadimethoxin).

Wenig ist bekannt über den Einfluß von Phenylbutazon oder Sulfinpyrazon auf in den Geweben gebundene Pharmaka (Anton und Rodriguez 1973: Sulfamethoxypyridazin, Toyka 1974: Phenprocoumon, Tolbutamid, Chlorpromazin am Humanhämoglobin.

Von Phenylbutazon ist bekannt, daß es in therapeutischen Konzentrationen seine hoch spezifischen Bindungsplätze absättigt und noch eine hohe Affinität zu Bindungsplätzen 2. Ordnung hat (Brodie 1964, Gillette 1973).

Phenylbutazon ist mit einem pk_a von 4,5 bei pH 7,0 zu über 99 % ionisiert. Für Substanzen, die mittels einer Ionenbindung gebunden werden, könnte Phenylbutazon ein verdrängendes Agens sein. Andererseits besitzt das Phenylbutazonmolekül mit zwei Benzolringen und einer aliphatischen Seitenkette (Butyl-) die Voraussetzung für starke Lipophilie und damit den Bindungscharakter der hydrophoben Wechselwirkung. Derart gebundene Pharmaka könnten auch durch Phenylbutazon in ihrer Bindung beeinflusst werden.

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der Bindungsbeeinflussung durch Phenylbutazon für jede Primärsubstanz gesondert besprochen werden:

Chinin

MG 324	pK_a 8,4 und 4,3
Ionisationsgrad bei pH 7,0	97 %

Chinin wurde von allen untersuchten Arzneistoffen am stärksten an Muskelhomogenat gebunden. Kein anionisches Pharmakon war höher gebunden. Für die Bindung an Muskelgewebe gilt nicht, daß anionische Arzneistoffe (Säuren) grundsätzlich höher gebunden werden (Klotz und Ayers 1953) als kationisch Arzneistoffe (Basen bei pH 7,0). Eine Beeinflussung der Bindung an Muskelgewebe konnte nicht einmal bei einer gegenüber dem Chinin zehnfach höheren Phenylbutazon Konzentration festgestellt werden. Dies entspricht der häufigen Beobachtung am Plasma, daß kationische Pharmaka (Basen) durch die Anwesenheit von anionischen Pharmaka (Säuren) in ihrer Bindung nicht beeinflusst werden (Anton 1960, Keen 1966). Baur (1969) zeigte am Rinderserumalbumin, daß Chinin und ein anionisches Pharmakon (Thiopental) sich nicht in der Bindung beeinflussen. Daß diese Beziehung nicht grundsätzlich gilt wurde für Morphin (siehe dort) nachgewiesen.

Sulfadimethoxin

MG 310	pK_a 6,32
Ionisationsgrad bei pH 7,0	83 %

An die Plasmaproteine von Mensch und Kaninchen ist Sulfadimethoxin zu über 98 % gebunden (Scholtan 1964, Friemel 1968). Die Bindung an Muskelhomogenat (Mensch) wurde von Fichtl (1974) mit 72,2 % bestimmt. Die Bindung an Kaninchen-Muskelhomogenat wurde von uns mit 31,9 % bestimmt. Sulfadimethoxin ist ein Beispiel dafür, daß Pharmaka im Plasma hoch, von der Muskulatur dagegen gering gebunden werden. Dies beweist, daß sich Plasma und Muskelgewebe in Bezug auf ihre Bindungseigenschaften unterscheiden.

Dies kommt auch bei der Wechselwirkung mit Phenylbutazon zum Ausdruck. Es ist wiederholt nachgewiesen worden, daß gerade Phenylbutazon und das chemisch verwandte Sulfinpyrazon (Anton und Rodriguez 1973 an der Ratte in vivo) auf im Plasma gebundene Sulfonamide im Sinne einer Verdrängung aus der Bindung einwirken. Sulfonamide und Phenylbutazon konkurrieren hierbei um derselben Bindungsplatz (Brodie und Hogben 1957, Thorp 1964). Dagegen haben wir für die Muskulatur nachgewiesen, daß die Bindung von Sulfadimethoxin durch die Anwesenheit von Phenylbutazon zunimmt (von 31,2 auf 42,2 %). Auch andere Autoren beschreiben eine Bindungszunahme im Gewebe durch Sulfadimethoxin: Wardell et al. (1971) haben mit homogenisiertem Muskelfleisch von Schafen gearbeitet. Die Messergebnisse zeigen unter dem Einfluß von Phenylbutazon eine Bindungszunahme von 6 % für ein dem Sulfadimethoxin verwandtes Sulfonamid (Sulfadoxine). Imamura et al. (1975) haben für Sulfadimethoxin am Kaninchen in vivo nachgewiesen, daß Phenylbutazon eine Verdrängung von den Bindungsplätzen im Plasma bewirkt, wobei die Gesamtkonzentration im Plasma absinkt und eine Rückverteilung ins Gewebe erfolgt. Die Ergebnisse von Wardell und Yorishige könnten durch unsere Ergebnisse eine Bestätigung finden: Die Bindungszunahme von Sulfadimethoxin durch Phenylbutazon könnte in vivo als Rückverteilung vom Plasma ins Gewebe in Erscheinung treten.

M o r p h i n

MG 285	pK_a 8,07
Ionisationsgrad bei pH 7,0	94 %

Die Erwartung, daß die kationische Morphinbase mit den anionischen Strukturen des Körpereiweißes ein Ionenbindung eingehen würde, wurde von Höllt (1973) widerlegt. Er hat für Plasma (Kaninchen und Mensch) und für Gewebehomogenat nachgewiesen, daß der dominierende Bindungsfaktor die hydrophobe Wechselwirkung ist. Höllt (1973) hat die

Bindung an Gehirnhomogenat (Mensch) mit 18 % gemessen. Die Bindung von Morphin an Muskelhomogenat (Mensch) ist 53,8 % (Fichtl 1974), und wir haben für Kaninchen-Muskelhomogenat 53,4 % Bindung gemessen.

Vergleicht man die Bindung an Plasma und an Muskelhomogenat beim Mensch (Höllt 1973, Fichtl 1974) und beim Kaninchen (Höllt 1973, eigene Werte) so zeigt sich wie beim Chinin, daß die Bindung von basischen (kationischen) Arzneistoffen an Muskelgewebe höher sein kann als an Plasma. Basische Arzneistoffe könnten eine stärkere Affinität zu den Gewebeproteinen besitzen als anionische Pharmaka (Way und Adler 1960), Ehrenpreis 1970).

Wir haben am Muskelhomogenat eine Freisetzung von Morphin durch Phenylbutazon gemessen. Auch eine Zunahme der Bindung von Morphin an Muskelhomogenat ist von Wachter (1977) gemessen worden (Bindungszunahme durch Promethazin). Bemerkenswert ist, daß Morphin als Base von einem sauren Pharmakon in der Bindung beeinflusst wird.

Phenprocoumon

MG 280	pK_a 5,6
Ionisationsgrad bei pH 7,0	96 %

Wenn bei der Pharmakotherapie Unverträglichkeiten von Arzneistoffkombinationen diskutiert werden, so fehlt kaum das Substanzpaar Phenprocoumon und Phenylbutazon. Stets wird die Interaktion mit dem Hinweis auf eine Verdrängung von den Plasmaproteinen erklärt. Wir haben für die Kaninchenmuskulatur nachgewiesen, daß auch der Verdrängung aus der Muskelbindung Beachtung geschenkt werden muß.

Für die chemisch fast identische Substanz Warfarin ist im amerikanischen und englischen Schriftum die Interaktion zwischen Phenylbutazon und Warfarin am Serumalbumin ausführlich untersucht worden (Solomon und Shrogie 1968, Aggeler et al. 1967, Vesell et al. 1975). Solomon konnte

nachweisen, daß am Albumin Phenylbutazon und Warfarin um denselben Bindungsplatz 1. Ordnung konkurrieren.

Unsere Messungen ergaben, daß Phenprocoumon durch Phenylbutazon in äquimolarer Konzentration vom Muskelprotein verdrängt werden kann. Die Bindung nimmt dabei von 66,1 % auf 62,7 % ab. Auf 61,3 % nimmt die Muskelbindung weiter ab, wenn Phenylbutazon in der Konzentration von 5×10^{-4} molar zugegeben wird.

Die von uns gemessene Verdrängung aus der Muskelbindung verläuft gleichsinnig mit der Verdrängung von Phenprocoumon durch Phenylbutazon im Plasma. Auch für Hämoglobin des Menschen ist eine Freisetzung von Phenprocoumon durch Phenylbutazon aus der Bindung nachgewiesen worden (Toyka 1974).

Quantitative Überlegungen:

Die Messwerte, die am Muskelhomogenat des Kaninchens erhalten wurden, können zu Überlegungen der Bedeutung in vivo führen. Da der nicht proteingebundene Anteil des Phenprocoumons 33,9 % beträgt, bedeutet eine gemessene Freisetzung von 3,4 % eine Zunahme des ungebundenen Phenprocoumon um 10 %. In dieser Höhe wirkt sich die freie Phenprocoumonkonzentration nicht aus, weil die Albuminbindung dieser gut lipoidlöslichen Substanz sehr hoch ist.

Bei einer Bestätigung dieser Ergebnisse für das Muskelprotein des Menschen ließe sich die klinische Interaktion von Phenylbutazon und Phenprocoumon so erklären, daß Phenprocoumon von den Plasmaproteinen freigesetzt wird, aber von einem großen Teil der bindungsfähigen Gewebe, der Muskulatur, nicht aufgenommen werden kann. Unsere Ergebnisse lassen noch vermuten, daß zusätzlich noch eine Freisetzung aus der Muskelbindung stattfindet.

Nitrofurantoin

MG 238	pK_a 7,2
Ionisationsgrad bei pH 7,0	39 %

Nitrofurantoin ist ein Pharmakon, dessen Gewebekonzentrationtion beim Tier als niedrig angegeben wird (Paul et al. 1960). Die besonders geringe Affinität zu Proteinstrukturen ließe sich mit der relativ starken Polarität der Ringstrukturen des Nitrofurantoins erklären, welche die Möglichkeit der Bindung durch hydrophobe Wechselwirkung schmälert. Die Bindung an Muskelhomogenat wurde mit 10,6 % bestimmt. Eine Freisetzung von Nitrofurantoins durch Phenylbutazon war nicht messbar.

Nitrosalizylsäure

MG 183	pK_a 2,3
Ionisationsgrad bei pH 7,0	99,9 %

Nitrosalizylsäure wurde als Beispiel einer relativ starken Säure gewählt. Bei pH 7,0 ist Nitrosalizylsäure vollständig ionisiert. Die Plasmabindung bei verschiedenen Tierspezies wurde zwischen 74 % und 99 % gefunden (Friemel 1968). Martin (1964) erwähnt, allerdings für den Menschen, daß ein hoher Blutspiegel keinen hohen Gewebespiegel garantiert. Wir fanden am Muskelhomogenat des Kaninchens eine Bindung von 60,0 %. Eine äquimolare Konzentration von Phenylbutazon (auch 10^{-4} molar) bewirkte zwar eine geringe Verdrängung auf 59,8 %, die sich aber als nicht signifikant herausstellte. Erst wenn Phenylbutazon in 5 bzw 10-facher Konzentration zugegeben wurde, zeigte sich in signifikantem Maße eine Freisetzung um 1,2 bzw 5,7 %. Yesair et al. (1970) und Chignell (1971) beschreiben, daß zumindest am Serumalbumin der Ratte die Bindungsstellen für Salizylsäure und Phenylbutazon nicht identisch sind.

Tolbutamid

MG 270	pK_a 5,4
Ionisationsgrad bei pH 7,0	97,5 %

Von Tolbutamid ist bekannt, daß es seinerseits Substanzen aus der Plasma-Proteinbindung verdrängen kann: Digitoxin, Diphenylhydantoin, Dicoumarol (Jähnchen et al. 1976). Solomon et al. (1968) haben eine kompetitive Verdrängung von Tolbutamid vom Serumprotein durch Phenylbutazon in vitro gemessen. Kurz (1970) zeigte am Kaninchen, daß eine nachweisbare Verdrängung von Tolbutamid vom Serumprotein durch Phenylbutazon in vitro gemessen, in vivo keinen Effekt, das heißt, keine Blutzuckererniedrigung zur Folge hat. Unsere Ergebnisse wären eine Erklärung für diese Beobachtung.

Wir konnten nachweisen, daß Tolbutamid aus der Bindung an die Muskulatur (29,6 %) durch Phenylbutazon nicht verdrängt wird. Die Verdrängung aus der Bindung an Kaninchenplasma, die von Kurz (1970) in vitro nachgewiesen worden war, könnte in vivo ohne blutzuckersenkende Wirkung bleiben, weil sich der freigesetzte ungebundene Pharmakonanteil auf ein Volumen verteilt, das wenigstens zehn mal so groß ist wie das Plasmavolumen (Muskulatur), und weil Tolbutamid dort nicht aus der Bindung verdrängt wird (siehe Ergebnistabellen).

Vergleicht man Tolbutamid und Phenprocoumon in ihrer Verdrängbarkeit durch Phenylbutazon, so ist die gleichsinnige Verdrängung von Phenprocoumon vom Plasma, vom Hämoglobin und vom Muskel beim Tolbutamid nicht vorhanden. Eine Verdrängung aus der Bindung an Muskulatur findet beim Tolbutamid nicht statt. Plasma und Muskulatur verhalten sich nicht gleichsinnig, wenn man die Beeinflussung der Bindung an die Proteine vergleicht.

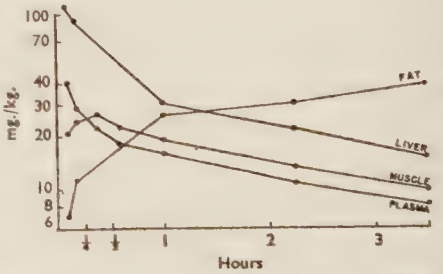
Schulz et al. (1971) geben an, daß die Potenzierung der hypoglykämischen Wirkung durch Phenylbutazon nicht pharmakokinetischer Natur sei.

Thiopental

MG 264 pK_a 7,6
Ionisationsgrad bei pH 7,0 26 %

Scholtan (1968) beschreibt für Thiopental nach Untersuchungen am Serumalbumin den Bindungsmechanismus der hydrophoben Wechselwirkung als dominierend. Klimek und Kurz (1969) haben nachgewiesen, daß die Bindung im Plasma mit steigendem pH Wert zunimmt. Die Bindung an Muskelhomogenat (Mensch) beträgt 95,0 % (Fichtl 1974). Baur (1969) hat am Serumalbumin (Rind) eine Bindungszunahme durch Phenylbutazon für Thiopental um 3,4 % nachgewiesen. Auch Csögör und Papp (1970) berichten von einer Zunahme der Bindung von Thiopental unter dem Einfluss eines anionischen Pharmakons (Sulfonamid). Weiterhin hat Toyka (1974) für Humanhämoglobin eine Zunahme des ungebundenen Thiopentalanteils um 11 % in Anwesenheit von Thiopental beschrieben.
Beim lebenden Kaninchen wird die Thiopentalnarkose in Anwesenheit von Phenylbutazon verlängert (Kurz und Baur 1967). An der Narkoseverlängerung kann die von uns gemessene Bindungszunahme beteiligt sein. Die Bindung von Thiopental an Muskelhomogenat nahm unter dem Einfluß von Phenylbutazon um 1 % von 66 % auf 67% zu. Brodie und Hogben (1957) haben in vivo für Thiopental (Hund) nachgewiesen, daß die Konzentrationsabnahme im Plasma und in der Muskulatur parallel verläuft (siehe Abb. 7).

Abb. 7: ist mit den Erläuterungen einem Review von Brodie und Hogben (1957) entnommen



Thiopentone levels in various tissues after intravenous administration of 25 mg./kg. to a dog.

Die von uns gemessene Anhebung der Bindung in der Muskulatur durch die Anwesenheit von Phenylbutazon, könnte somit zugleich eine Anhebung der Konzentration an Thiopental im Plasma zur Folge haben. Hierbei ist vorausgesetzt, daß Kaninchen und Hund eine ähnliche Verteilungskinetik für Thiopental haben, und daß von Messungen mit Muskelhomogenat auf die Muskulatur im lebenden Organismus geschlossen werden kann.

3. Diskussion der Bindung an Muskelgewebe

a) Die Bindung an Muskelgewebe

Wo und wie Pharmaka an Albumin gebunden werden, darüber hat man bessere Vorstellungen als über die Bindung von Pharmaka an Muskelgewebe.

Für herzwirksame Glykoside kennt man die Bindung an Actomyosin und lösliche kontraktile Elemente (Ehrenpreis 1970). Arora et al. (1963) fanden für Chinidin eine überwiegende Bindung an die Kerne bzw. an DNA und RNA der Muskulatur des Herzens. Das Muskelhomogenat wird, was die Bindungseigenschaften anbetrifft, für gleichwertig mit dem intakten Muskel erachtet. Die Ergebnisse zeigen eine gute Übereinstimmung der relativen Anreicherung von Chinidin in den Kernen (52 %), Sarcosomen (8 %) und überstehenden Fraktionen (33 %) beim Ganztier und beim Homogenat. Whichard (1968) konnte selbst an denaturiertes DNA noch eine gute Bindung feststellen. An die intakte und an die homogenisierte Muskulatur des Zwerchfells (Ratte) werden Pharmaka in gleichem Ausmaß gebunden (Filous et al. 1976).

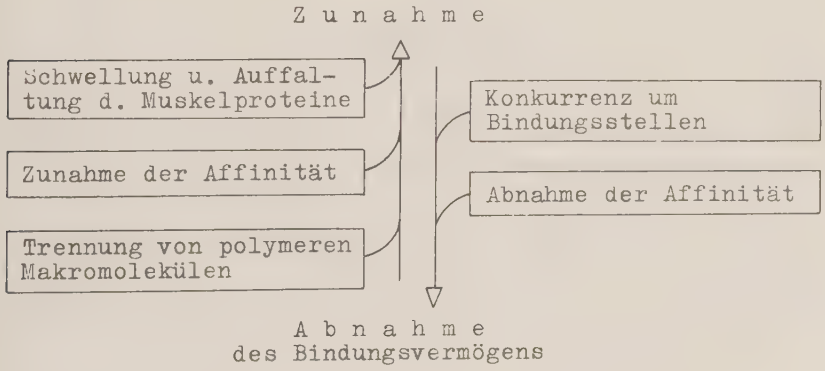
Myosin (isoelektr. Punkt bei pH 5,4) und Aktin (isoelektr. Punkt bei pH 4,7) tragen bei pH 7,0, dem intrazellulären pH wert der Kaninchenmuskulatur eine negative Ladung. Diese beruht hauptsächlich auf Carboxylgruppen (Szent-Györgyi 1951). Die gute Bindungsfähigkeit des Muskelgewebes für Kationen (Chinin und Morphin) könnte daher teilweise auf eine Ionenbindung zurückzuführen sein. Andere Bindungsmechanismen wie die Bindungskräfte elektrostatischer Natur und die Bindung auf Grund hydrophober Wechselwirkung werden als bedeutender angesehen (Scholtan 1968, Höllt 1973 für Gehirnhomogenat). Hierbei sind die lipophilen Molekülanteile des Pharmakons von Bedeutung.

Die Bindung von Arzneistoffen bleibt auf die bindenden Strukturen (hauptsächlich Proteine) nicht ohne Einfluß. Vermutet

oder nachgewiesen sind Konformationsänderungen der Kohlenstoffketten (O'Reilly 1967) und Viskositätsänderungen durch Schwellung und Auffaltung der Makromoleküle (Scholtan 1964). Nunes (1973) weißt durch Röntgenstrukturanalyse am Myoglobin nach, daß bei der Bindung kleiner Moleküle sich das Protein anpassen kann und daß mit steigender Molekülgröße eine Deformation des "Bindungsplatzes" eintritt. Levine et al. (1968) konnten bei der Bindung von Chlorpromazin an Myosin B Veränderungen von physikalischen Eigenschaften wie Fluoreszenzlöschung und Polarisation nachweisen.

b) Die Beeinflussung der Bindung an Muskelgewebe

Eine Beeinflussung der Bindung einer Primärsubstanz durch ein zweites Pharmakon wird für das Muskelgewebe in der Literatur nur selten in Erwägung gezogen. Sicherlich lassen sich die Theorien einer Bindungsbeeinflussung, die für die Albuminbindung aufgestellt worden sind, nur begrenzt auf das Muskelgewebe übertragen. In Anlehnung an Franz et al. (1969) läßt sich für die Bindungsbeeinflussung eines gebundenen Pharmakons ein Schema aufstellen:



a) Haben zwei Pharmaka denselben Bindungsplatz, wäre eine kompetitive Verdrängung wahrscheinlich.

b) Wird ein zweites Pharmakon zusätzlich gebunden, werden durch Molekülauffaltung evtl. neue Bindungsplätze geschaffen oder alte zerstört. Eine Verdrängung könnte also durch gleichzeitiges Entstehen neuer Bindungsplätze maskiert sein.

c) Die Tertiärstruktur des Makromoleküls läßt durch Konformationsänderung neue Bindungsplätze entstehen Scholtan (1964).

d) Ein Ionenkomplex könnte höher gebunden sein als ein Pharmakon allein (Gillette 1963).

c) Die Zunahme der Bindung an Muskelgewebe

Neuere Veröffentlichungen, z.B. Arzneimittelbrief Jahrg. 10 Nr. 1, führen unter dem Begriff "Interaktion von Pharmaka" nur eine Verdrängung aus der Bindung an. Eine Bindungszunahme wird nicht in Erwägung gezogen. Wir haben für Thiopental und Sulfadimethoxin eine Zunahme der Bindung an Muskelhomogenat gemessen. Auch "in vivo" sind von Mc.Queen und Wardell (1971) und von Imamura et al. (1974) am Schaf bzw. an Kaninchen Verlagerungen von Sulfadoxine bzw. Sulfadimethoxin vom Plasma ins Gewebe gemessen worden. Das zusätzlich applizierte Phenylbutazon könnte eine Bindungszunahme der Sulfonamide im Gewebe bewirkt haben. Pharmakokinetisch kann die Bindungszunahme im Gewebe über eine Ausscheidungsverzögerung eine Wirkungsverlängerung bewirken.

Eine Übersicht mit Veröffentlichungen über Mehrbindung eines Pharmakons durch ein zweites Pharmakon zeigt folgende Tabelle:

Arzneistoff	gemessene Bindungszunahme für:
Acetylcholin	Atropin (am Rinderserumalbumin) Biochem. Pharmacol. 11 (1962) 1213
Suramin	Promazin (am Rinderserumalbumin) Arch. Pharmcol. 260 (1968) 147
Sulfinpyrazon Phenylbutazon	Thiopental und Nitrofurantoin (Rinderserumalbumin) Baur (1968) med.Diss.
Sulfamethoxidiazin	Chlorpromazin (Rinderserumalbumin) Arch.Pharmacol. 264 (1969) 462-475
Tetracyclin	Promazin und Chlorpromazin (Rinderserumalb.)Arch.Pharm. 264(1969) 261
2 Sulfonamide	Thiopental Arzneimittelforsch. 20 (1970) 1925
Phenylbutazon	Sulfadoxine (Schaf in vivo) Brit. J. Pharmacol.43 (1971) 425
Chlorothiazid	Pempidine (Serum Mensch in vivo) Biochem.Biophys.Ac. 229 (1971 610
Harnstoff	Doxycyclin, Sulfaethylthiazol (Alb.) J. Pharm. Pharmacol. 24 (1972) 981
Acetylsalizylsäure	Röntgen Kontrastmittel Am. N.Y. Acad. Sci. 226 (1973) 341
Thiopental	Promazin (Hämoglobin Mensch) Toyka (1974) med. Dissert. München
Prometacin	Morphin (Muskelhomogenat Kaninchen) Wachter (1977) med. Dissert. München
Phenylbutazon	Sulfadimethoxin und Thiopental (Muskelhomogenat Kaninchen) eigene W.

Tabelle 3: Tabellarische Übersicht mit Veröffentlichungen über Bindungszunahmen

d) Auswirkung einer Bindungsänderung im Gewebe

Die graphische Darstellung der Auswirkung einer Bindungsänderung im Gewebe beruht auf einem Körpermodell, wie es von Curry (1970) vereinfachend angegeben worden ist:

Der Körper besteht nur aus Plasma und einer Art von Gewebe. Das Verhältnis von Plasmavolumen zum Gewebevolumen sei 1 : 10. Die Konzentration an Arzneistoff sei 10 µg/ml.

Unter der Voraussetzung, daß die Konzentration an nicht gebundenem Arzneistoff $[A_f]$ im Gewebe und im Plasma gleich ist und die Bindung im Plasma unveränderlich 95 % sei, ergibt sich die Verteilung des Arzneistoffs in diesem Körper abhängig von der Gewebebindung wie in der graphischen Darstellung aufgezeigt.

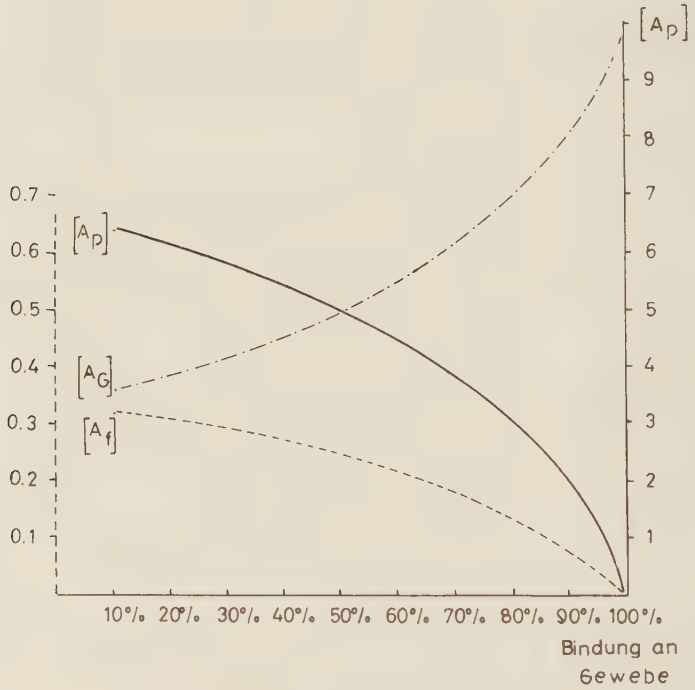


Abb.8: Graphische Darstellung der Gesamtkonzentration an Arzneistoff im Gewebe $[A_G]$, im Plasma $[A_P]$ und die Konzentration an ungebundenem Arzneistoff $[A_f]$ während variabler Bindung im Gewebe im oben beschriebenen Körpermodell. Die Plasmabindung sei unveränderlich 95 %.

Die graphische Darstellung soll verdeutlichen, wie Bindungsänderungen im Gewebe sich auf die Gesamtkonzentration an ungebundenem Arzneistoff $[A_f]$ im Körper auswirken, obwohl im Plasma keine Änderung der Bindung stattfindet (Bindung im Plasma gleichbleibend 95 %).

d) Vergleich von Bindung an Plasma
und an Muskelgewebe

Die Pharmaka dieser Arbeit (+ Chlorpromazin) wurden, wenn entsprechende Werte aus der Literatur zur Verfügung standen, in Bezug auf ihre Bindung an Muskelhomogenat und an Plasma verglichen. Die Bindungswerte an Muskelhomogenat (Mensch und Kaninchen) wurden nach der Formel von Seite 9 für eine Konzentration von 90 % Muskulatur im Homogenat berechnet.

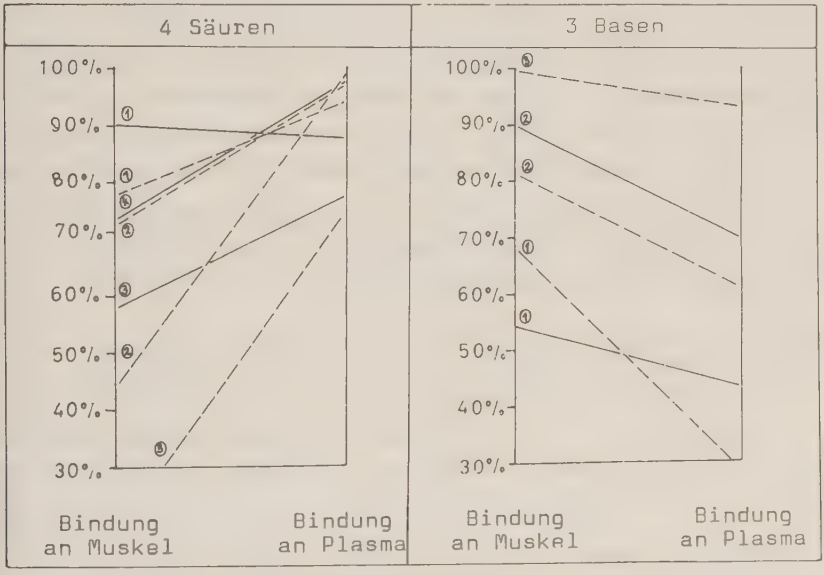


Abb. 9: 4 Säuren (Thiopental[1] Sulfadimethoxin[2] Nitrofurantoin[3] Nitrosalizylsäure[4])
3 Basen: (Morphin[1] Chinin[2] Chlorpromazin[3])
Vergleich der Bindung an Muskelgewebe (Konzentration an Muskelgewebe im Homogenat 90 %) und an Plasma

Die basischen Pharmaka (Morphin, Chinin, Chlorpromazin) zeigen eine höhere Bindung an Muskelhomogenat gegenüber der Plasmabindung. Die sauren Pharmaka (Thiopental, Nitrofurantoin, Sulfadimethoxin, Nitrosalizylsäure) haben im Gegensatz eine zum Teil wesentlich niedrigere Bindung an Muskelhomogenat im Vergleich zur Bindung an Plasma (Ausnahme Thiopental Mensch).

Die Bindungseigenschaften von Plasma und Muskelhomogenat sind demnach quantitativ und sehr wahrscheinlich auch qualitativ unterschiedlich. Unsere Ergebnisse lassen vermuten, daß am Muskelhomogenat die Ionenbindung eine grössere Bedeutung hat im Vergleich zur Bindung an Plasma bzw. an Albumin. Sicherlich muß die Aussage von Scholtan (1964) angezweifelt werden, daß von der Bindung an Serum auch auf die Bindung an Gewebe geschlossen werden kann. Das Plasma ist kein "zirkulierendes flüssiges Gewebe" (Goldstein 1949).

Die Werte für die graphische Darstellung der Bindung im Plasma (bzw im Albumin) und im Muskelhomogenat von Mensch und Kaninchen entstammen den Quellen:

Friemel 1968, Höllt 1973, Fichtl 1974, Wachter 1977.

V. Zusammenfassung

Die Bindung von 8 Pharmaka an homogenisierte Kaninchenmuskulatur wurde bestimmt.
Zugleich wurde untersucht, wie sich die Bindung dieser Pharmaka an Muskelgewebe ändert, wenn Phenylbutazon in äquimolarer Konzentration dem Ansatz zugegeben wird.
Bei vier Pharmaka wurde die Phenylbutazonkonzentration zusätzlich zur äquimolaren Konzentration (10^{-4} molar) auf das 5 fache bzw. das 10 fache erhöht. Für die Messungen des gebundenen Anteils Pharmakon an Muskelhomogenat kam die Methode der Ultrafiltration zur Anwendung.

Chinin, Nitrofurantoin und Tolbutamid blieben in ihrer Bindung an Muskelgewebe durch die Anwesenheit von Phenylbutazon unbeeinflusst. Für Sulfadimethoxin und Thiopental konnte eine Bindungszunahme durch Phenylbutazon nachgewiesen werden. Morphin, Phenprocoumon und Nitrosalizylsäure wurden durch die Anwesenheit von Phenylbutazon teilweise aus der Bindung an Muskelgewebe freigesetzt.

Beim Vergleich der Bindung an Muskelgewebehomogenat und an Plasma (Kaninchen) zeigte sich das Folgende:
Bei pH 7,0 kationische Pharmaka (Basen) waren an Muskelhomogenat höher gebunden; anionische Pharmaka (Säuren) waren stets höher an Kaninchenplasma gebunden.

Für die bekannte Interaktion von Phenprocoumon und Phenylbutazon haben wir nachgewiesen, daß eine Verdrängung aus der Bindung an Muskelgewebe beteiligt sein kann. Die von uns festgestellten Bindungszunahmen könnten eine Wirkung auf die Ausscheidungskinetik haben.

VI. Literaturverzeichnis

AGGELER P.M., O'REILLY R.O., LEONG L., KOWITZ:
Potentation of anticoagulant effekt of warfarin by Phenylb.
New England J. of Medicine 276 496 - 501 (1967)

ANTON A.H., The relation between the binding of sulfonamides to albumin and the antibacterial efficacy.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 129 282 (1960)

ANTON A.H., RODRIGUEZ R.W.: Drug induced Change in the distribution of Sulfonamides in the mother rat and its fetus.
Science 180 974 - 976 (1973)

ARORA R.B., SHARMA J.N., TARAK T.K., SAXENA Y.R.:
The binding of quinidine to myocardial cellular components.
J. Pharm. Pharmacol 15 151 (1963)

BAUR J.: Die Beeinflussung der Bindung von Arzneimitteln durch andere Stoffe und die Bedeutung dieses Vorgangs für die pharmakologische Wirkung.
Dissertation Universität München (1969)

BRATTON A.C., MARSHALL E.K.jr.:
A new coupling component for sulfanilamide determination.
J. biol. Chem. 128 537 - 550 (1939)

BRODIE B.B., MARK L.C., PAPPER E.M., LIEF P.A., BERNSTEIN E., ROVENSTEIN E.A.: The fate of thiopental in man and a method for its estimation in biological material.
J. Pharmacol. Exptl. Therap. 98 85-96 (1950)

BRODIE B.B., HOGBEN C.A.M.:
Some physico-chemical factors in drug action.
J. Pharm. Pharmacol. 9 345 - 380 (1957)

BRODIE B.B.: Distribution and fate of drugs
F.B. Binns ed. Livingstone, Edinbourg, London (1964)

BRUCK v., KUHNE W.: Zur Bestimmung der Eiweißbindung von Sulfonamiden mittels der Ultrafiltermethode.
Arzneimittelforschung 12 1116 - 1119 (1962)

BURNS J.J., ROSE R.K., CHENKIN T., GOLDMANN A. SCHULERT A. BRODIE B.B.: The physiological disposition of phenylbutazone in man and a method for its estimation in biological material.
J. Pharmacol. 109, 346 - 357 (1953)

CHIGNELL C.F.:
Physical methods for studying drug protein binding.
Handbuch der experiment. Pharmakologie 28 187 - 212 (1971)

CRAIG L.C., KONIGSBERG W.M.: Dialysis studies III: Modification of pore size and shape in cellophan membranes.
J. Phyical. chem. 65 ,166 - 172 (1961)

CRAIG L.C., KING T.P.: DIALYSIS in:
Methods of biochemical analysis, Voix ed.: D. Glick
Interscience Publ. New York, London, Sydney (1966)

CRAIG L.C., ANSEVIN A.:
Dialysis studies VI: Experiments with amino acids.
Biochemistry 2, 1268 - 1271 (1963)

CSÖGÖR S.J., PAPP J.: Competition between sulfonamides and thiopental for the binding sites of plasma proteins.
Arzneimittelforschung 20 1925 - 1927 (1970)

CURRY S.H.: Theoretical changes in drug distribution resulting from changes in binding to plasma proteins and tissue
J. Pharm. Pharmacol. 22 753 - 757 (1970)

EHRENPREIS S.: Drug-macromolecular interactions
Fortschritte d. Arzneimittelforsch. 14 59 - 138 (1970)

EISEN M.J., YONKERS N.Y.:
Combines effect of sodium warfarin and phenylbutazone.
J. Americ. med. Ass. 189, 64 (1964)

FELDMANN I., DANLEY R.A., O'LEARY J.F.:
Improved centrifuge type of ultrafiltration apparatus.
Analyt. Chem. 22, 837 - 838 (1950)

FICHTL B.:
Die Bindung von Pharmaka an menschliches Muskelgewebe.
Dissertation München (1974)

FILOUS N., FICHTL B., KURZ H.:
Binding of drugs to muscle tissue.
Arch. Pharmacol. Vol. 293 Suppl. R 46 (1976)

FRANZ J.W., JÄHNCHEN E., KRIEGELSTEIN J.:
Der Einfluß verschiedener Pharmaka auf das Bindungsvermögen einer Albuminlösung für Promazin und Chlorpromazin.
Arch. Pharmac. exp. Path. 264 462 - 475 (1969)

FRIEMEL G.: Die Bindung von Arzneimittel an die Plasmaproteine verschiedener Tierarten.
Dissertation Universität München (1968)

FRUNDER: Die H-Ionenkonzentration im Gewebe lebender Tiere nach Messungen mit der Glaselektrode.
Arbeitsgem. med. Verlage: G. Fischer, Jena (1951)

GILLETTE J.R.:
Reversible binding as a complication in relating the in vitro effect of drugs to their in vivo activity.
Proc. 2nd Int. Pharmacol. Meeting, Vol. 4, 9 - 12 (1963)

GILLETTE J.R.:
The importance of tissue distribution in pharmakokinetics.
J. Pharmakokin. and Biopharmaceutics 1, 497 (1973)

GOLDBAUM L.R.: An ultraviolet spectrophotometric procedure for the determination of barbiturates. J. Pharmacol. 94, 68-75 (1948)

Goldstein Avram:
Interaction of drugs and plasma proteins.
Pharm. Rev. 1, 102-165 (1949)

HANSTEIN: Drug interactions
Lea & Febiger, 2nd. Ed., Philadelphia

HASSELBACH W.:
Physiologie des Menschen: Muskel
Gauer/Kramer/Jung, Urban Schwarzenberg, München (1971)

HÖLLT:
Über die Bindung morphinartiger Analgetica an Plasma und Gewebehomogenat.
Dissertation Universität München (1973)

IMAMURA Y!? SHIGEMORI K., ICHIBAGASE H.:
Effect of simultaneous administration of drugs on absorption and excretion. Effect of phenylbutazone on antibacterial activity and distribution of sulfadimethoxine in rabitts. Chem. Pharm. Bull. 23, 1377-1380 (1975)

JÄHNCHEN E., MEINERTZ T., GILFRICH H.J., GROTH U.:
Pharmakokinetic analysis of the interaction between dicoumarol and tolbutamide in man.
Europ. J. of Clin. Pharmacol. 10, 349-356 (1976)

KEEN P.M.:
The displacement of three anionic drugs from binding to bovine serum by various anionic compounds.
Brit. J. Pharmacol. 26, 704-712 (1966)

KLOTZ J.M., AYERS J.:
Protein interaction with organic molecules-
Disc. Faraday Soc. 13, 189 (1953)

KRISTENSEN M.B.:
Drug interaction and clinical pharmakokinetics.
J. of Clinic. Pharmakokinetics 1, 131- 354 (1976)

KUNIN C.M.:
Clinical pharmacology of the new Penicillins I.
Clin. Pharmac. Therap- 7, 166-179 (1966)

KUPFERBERG H., BURKHALTER A., WAY E.L.:
A sensitive fluorometric assay for morphine in plasma
and brain. Univ. of California, Medical Center (1964)

KURZ H.:
Die Bedeutung der Lipoidlöslichkeit in der Pharmakologie.
Präparative Pharmazie 6, 1-12 (1970)

KURZ H., BAUR J.: Der Einfluß von Phenylbutazon auf die
Bindung von Thiopental an Plasmaproteine.
Vortrag Frühjahrstagung Mainz (1967)

KURZ H., TRUNK H., WEITZ B.:
The evaluation of methods to determine protein binding
of drugs.
Drug research 27(II)7, 1373-1380 (1977)

LEVINE R.J.C., TELLER D.N., DENBER H.C.B.:
Binding of chlorpromazine and thioperazine in vitro:
fluorometric measurement of changes in myosin B structure
and enzyme activity after treatment with phenothiazine drugs.
Mol. Pharmacol. 4, 435-444 (1968)

KlIMEK, KURZ H.: Short Communication, 4 th Int. Congr.
on Pharmacology, Basel (1969)

LUDDEN M., SCHANKER L.S., LANMAN R.C.:
Binding of organic compounds to rat liver and lung.
Drug metabolism and disposition Vol. 4,1 Jan/Feb (1976)

MARTIN B.K.:
Absorption and distribution of salicylates.
In: T.B.Binns ed.: Absorption and distribution of drugs.
S. 165 - 172 (1964), Livingstone Ltd., Edinburgh-London

NIEDNER R., v.OETTINGEN U., MEYER Fr.:
Bindung von Phenprocoumarol (Marcumar^{R}) an Humanalbumin.
Int. J. Pharmacol. 8, 160 - 166 (1973)

NUNES A.C., SCHOENBORN B.P.:
Dichlormethan and myoglobin function.
Mol. Pharmacol. 9, 835 - 838 (1973)

PAUL M.F., PAUL H.E., BENDER R.C., KOPKO F., HARRINGTON C.M.:
Studies on the distribution and excretion of certain nitrofurans.
Antibiot. and Chemoth. 10, 287 - 302 (1960)

MC.QUEEN E.G., WARDELL W.M.:
Drug displacement from protein binding: isolation of a redistributional drug interaction in vivo.
Brit. J. Pharmacol. 43, 312 - 324 (1971)

O'REILLY R.A.:
Studies an the coumarin anticoagulant drugs: Interaction of human plasma albumin and warfarin sodium.
J. Clin. Investigation 46, No.5 829 - 837 (1967)

RENKIN E.M.:
Filtration, diffusion and molecular sieving through porous cellulose membranes.
J. gen. Physiol. 38, 225 - 243 (1955)

RIEDER J.:
Physikalische, chemische und biologische Untersuchungen an Sulfonamiden.
Arzneimittel-Forschung 13, 81-88 (1963)

SCHOLTAN W.:
Die Bindung der Sulfonamide an Eiweißkörper (3.Mitteilung)
Arzneimittel-Forschung 18, 348-350, 1234-1238 (1964)

SCHOLTAN W.:
Die hydrophobe Bindung von Pharmaka an Humanalbumin und Ribonucleinsäuren.
Arzneimittel-Forschung 18, 505-517 (1968)

SCHULZ E., KOCH K., SCHMIDT F.H.:
Ursachen der Potenzierung der hypoglykämischen Wirkung von Sulfonylharnstoffderivaten durch Medikamente.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 4, 32-37 (1971)

SEILER K., DUCKERT F.:
Properties of Marcumar^{R} in the plasma when tested in nor-normal cases and unter the influence of drugs.
Thromb. Diathes. Haemorrh. (Stuttgart) 19, 389-395 (1968)

SIGG A., RESTALOZZI H., CLAUS F., KOLLER F.:
Verstärkung der Anticoagulantionwirkung durch Butazolidin.
Schweizer med. Wochenschrift 86, 1194-1195 (1956)

SOLOMON H.M., SHROGIE J.J., WILLIAMS D.:
The displacement of phenylbutazon-C^{14} and warfarin-C^{14} from human albumin by various drugs and fatty acids.
Biochem. Pharmacol. 17, 143-151 (1968)

SPINGLER H.:
Über die Möglichkeit zur colorimetrischen Bestimmung von Tolbutamid in Serum.
Klin. Wochenschrift 35, 533-535 (1957)

THORP J.M.:
The influence of plasma proteins on the action of drugs.
T.B.BINNS: Absorption and distribution of drugs. Ed.
Livingstone Ltd. Edinburgh-London 64-76 (1964)

TOYKA G.:
Gegenseitige Beeinflussung von Pharmaka bei ihrer Bindung
an Humanhämoglobin.
Dissertation Universität München (1974)

VESELL E.S., PASSANANTI G.T., JOHNSON A.O.:
Failure of indomethacin and warfarin to interact in
normal human volunteers.
J. Clin. Pharmacol. 15, 486-495 (1975)

WACHTER I.:
Wechselwirkung von Arzneimitteln bei ihrer Bindung am
Muskelgewebe.
Dissertation Universität München (1977)

WARDELL W.M., MC.QUEEN E.G.:
Drug displacement from protein binding: source of sulfa-
doxine liberated by phenylbutazon.
Brit. J. Pharmacol 43, 325-334 (1971)

WAY E.L., ADLER T.K.:
The pharmacologic implications of the fate of morphine
and its surrogates.
Pharm. Rev. 12, 383-446 (1960)

WESSELING A., MOLS'THÜRKOW J.:
The interaction of diphenylhydantoin and tolbutamide in man.
Europ. J. Clin. Pharmacol. 8, 75-78 (1975)

WHICHARD L.P., MORRIS C.R., SMITH J.M.:
The binding of promaquine, pentaquine, pamaquine and plasmacid to desoxyribonucleic acid.
Mol. Pharmacol. 4, 630-639 (1968)

YESAIR D.W., REMINGTON E., KEUSLER C.J.:
Comparative effects of salicyl acid, phenylbutazon, probenecid and other anions with metabolism, distribution and excretion of indomethacin by rats.
Biochem. and Pharmacol. 19, 1591-1600 (1970

L e b e n s l a u f

Am 12. Dezember 1947 wurde ich in Stuttgart geboren. Mein Vater Viktor Ziegler ist selbstständiger Kaufmann. Meine Mutter Lotte Ziegler geb. Bretschneider ist gelernte Krankenschwester.

Schulbildung:

Volksschule in Stuttgart (1954 - 1958)
Wagenburggymnasium Stuttgart (1958 - 1967)
Abitur: 6. Juni 1967

Pharmazie Studium:

Praktische Ausbildung in der
Katharinenhospital-Apotheke Stuttgart (1967/68)
Charlotten-Apotheke Stuttgart (1968/69)
Studium an der Universität München (1969 - 1972)
Staatsexamen: 17. Oktober 1972

Medizin Studium:

an der Universität München (1972 - 1977)
davon im praktischen Jahr (Internatsjahr):
- 4 Monate Universitäts Nervenklinik, München
- 4 Monate II. Medizinische Universitätsklinik, München
- 4 Monate Chirurgische Klinik im städt.Krkh. Schwabing

Ärztliche Prüfung: 15. Oktober 1977

Seit dem 1. November 1977 leiste ich meine Wehrpflicht in der Funk-Kaserne München als Stabsarzt ab.

Dissertations- und Fotodruck ANNELIESE SCHUBERT
Corneliusstraße 21 · 8000 München 5 · Telefon 268177